

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

3/8/99

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

YCT-421

Box No. I TITLE OF INVENTION

MUTANT BARNASE GENE AND TRANSGENIC PLANT TRANSFORMED BY SAID GENE

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

JAPAN TOBACCO INC.

2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku,

Tokyo 105-8422 Japan

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HAMADA, Kazuyuki

c/o Japan Tobacco Inc., Plant Breeding and Genetics Research Laboratory
700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SHAMOTO, Ichio, (8970) Patent Attorney

YUASA AND HARA, Section 206, New Ohtemachi Bldg., 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan

Telephone No.

(03) 3270-6641

Facsimile No.

(03) 3246-0233

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.



Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

NAKAKIDO, Fumio

c/o Japan Tobacco Inc., Plant Breeding and
Genetics Research Laboratory
700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun,
Shizuoka 438-0802 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
Japan

State (that is, country) of residence:
Japan

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☒ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.



Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐
- ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:
 - (i) if more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. II" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. II;
 - (v) if, in Box No. I, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. I, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. I" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
 - (vi) if, in Box No. I, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. I" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. I;
 - (vii) if, in Box No. I, the earlier application is an ARIPO application: in such case, write "Continuation of Box No. I", specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed.
2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. I, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.
3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: in such case, write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below.

"Continuation of Box No. IV"

The same address as Box IV

IMAI, Shosuke, (7112) Patent Attorney

MASUI, Chuji, (7669) Patent Attorney

KURITA, Tadahiko, (7523) Patent Attorney

KOBAYASHI, Yasushi, (7527) Patent Attorney

MURAKAMI, Kiyoshi, (9288) Patent Attorney



1

2



Box No. VI PRIORITY CLAIM			<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office	
item (1) 4/8/1998	220060/1998	Japan			
item (2)					
item (3)					

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / JP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 5
description (excluding
sequence listing part) : 12
claims : 2
abstract : 1
drawings :
sequence listing part
of description : 12
Total number of sheets : 32

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☒ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international application into (language):
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☒ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☒ other (specify): Request for transmittal of Priority Document, Statement, and Information Such as recording Form or Flexible Disk

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application:

Japanese

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

SHAMOTO, Ichio, (8970) Patent Attorney
IMAI, Shosuke, (7112) Patent Attorney
MASUI, Chuji, (7669) Patent Attorney
KURITA, Tadahiko, (7523) Patent Attorney
KOBAYASHI, Yasushi, (7527) Patent Attorney
MURAKAMI, Kiyoshi, (9288) Patent Attorney

For receiving Office use only		
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	





特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/55, 9/22, 15/82, A01H 1/00, 5/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/08176 (43) 国際公開日 2000年2月17日(17.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04167 (22) 国際出願日 1999年8月3日(03.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/220060 1998年8月4日(04.08.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP] 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 浜田和行(HAMADA, Kazuyuki)(JP/JP] 中木戸文夫(NAKAKIDO, Fumio)(JP/JP] 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: MUTATED BARNASE GENE AND PLANT TRANSFORMED BY THE SAME (54)発明の名称 変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物 (57) Abstract A male sterile plant which is free from any undesirable character is constructed by expressing a barnase gene alone specifically in the anther. The barnase gene, which has been depressed by mutagenesis while sustaining its activity, is transferred into a plant and then expressed specifically in the anther to thereby efficiently give the aimed male sterile transformant.		

(57)要約

バルナーゼ遺伝子を単独で薬特異的に発現させることにより、植物に生じる好ましくない形質を伴わない雄性不稔植物を作出する。変異を生じさせることにより活性を保持しつつも低下させたバルナーゼ遺伝子を植物に導入し、薬特異的に発現させることにより、効率よく雄性不稔植物の形質転換体を得る。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物

- 5 本出願は、1998年8月4日出願の、日本国特許出願平成10年第220060号に基づく優先権を主張している。その内容は本明細書に援用される。

発明の属する技術分野

- 10 本発明は、植物の特定部位、特に蒴に特異的に発現させることにより、効率よく雄性不稔形質転換体が得られる変異バルナーゼ遺伝子に関する。本発明はまた、本発明の変異バルナーゼ遺伝子を、宿主細胞中で発現することができる組換えベクター、該ベクターにより形質転換された植物、および形質転換植物の作出方法に関する。

従来技術

- 15 バルナーゼ (barnase) はバチルス・アミロリクイファシエンス (Bacillus a myloliquifaciens) 由来のRNA分解酵素 (RNase) である (S. Nishimura and M. Nomura, Biochem. Biophys. Acta 30, 430-431:1958; R. W. Hartley, J. Mol. Biol., 202, 913-915:1988)。本酵素はアミノ酸残基110個を有し、RNAを加水分解する酵素である。本酵素が細胞内で発現すると、その強力なRNA分解活性により細胞機能が阻害され、多くの場合細胞は死滅する。その性質を利用して、バルナーゼの遺伝子を植物の所定の部位に発現させることができれば、当該部位の機能を選択的に抑制することができる。
- 20

- 25 PCT出願国際公開第8910396号には、上記のバルナーゼ遺伝子を蒴組織のタペータム細胞に特異的な発現プロモーターの下流に結合して作成した雄性不稔遺伝子を植物に導入し、雄性不稔植物を得る技術が報告されている。このような雄性不稔化技術は効率の良いF1ハイブリッド品種の開発において非常に有用である。

しかし、バルナーゼ遺伝子を雄性不稔遺伝子として使用した場合には、雄性不稔形質転換体が、好ましくない形質を示す場合がしばしば観察されている。PCT出願国際公開第9626283号にはイネにおけるこのような問題が述べられているが

、イネだけでなくレタスにおいても同様な現象が報告されている (Scientia Horticulturae 55, 125-139:1993; Arlette Reymaerts, Hilde Van de Wiele, Greta De Sutter, Jan Janssens: Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed production)。その報告によるとタバコ由来の
5 薬特異的プロモーター (TA29) とバルナーゼを用いた雄性不稔遺伝子をレタスに導入した場合、活力の低下した植物体が見れる。

このような現象の正確な原因は解明されていないが、たとえば、いわゆる遺伝子導入部位の「位置効果」の影響がそのメカニズムとして想定されている (PCT
10 出願国際公開第9626283号)。より具体的には、雄性不稔遺伝子が目的とする部位である薬でのみ発現すれば希望する雄性不稔植物が作成できるが、当該遺伝子の導入部位近傍に存在する内在性のエンハンサー等の発現調節因子の影響で薬組織以外でもバルナーゼがごく微量発現する可能性がある。このような場合、酵素活性が強力であるために、上述した好ましくない形質が見れることが考えられる。

この問題を克服するために、PCT出願国際公開第9626283号にはまた、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (以下、CaMV35Sプロモーターという) の
15 薬以外の組織で強力に発現するという性質を利用した次のような方法が記載されている。すなわち、バルナーゼに対する阻害剤 (barstar) を使用する方法であり、CaMV35Sプロモーターに結合したバースター遺伝子を植物体に同時に導入して薬以外の組織でバースター遺伝子を構成的に発現させることにより、薬以外におけるバルナーゼの影響を排除するというものである。
20 。しかしながら、この方法ではバルナーゼ遺伝子のみならず、バースター遺伝子も導入しなければならず、これにより、この技術をイネやトウモロコシ等の種子を利用する作物のF1品種育成に応用する際にジーンサイレンシング (gene silencing) の問題が起こる恐れがある。ジーンサイレンシングとは、植物において、
25 複数コピーの外来遺伝子を導入することにより、その遺伝子の発現が抑制されてしまう現象である。現在のところ、そのメカニズムは明確でないものの、特に外来遺伝子を35Sプロモーターにより発現させた場合にこの問題が起こりやすいとされている (R. B. Flavell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3490-3496:1994; J. Finnegan, Bio. Technology 12, 883-888:1994; M. A. Matzke and A. J. M. Matzke,

Plant Physiol., 107, 679-685:1995)。イネやトウモロコシにおいては、花粉親（父親）に「稔性回復遺伝子」としてバースター遺伝子を保持させることにより、F1世代で花粉の稔性を回復させるという方法が採られており（C. Mariani, et al., Nature 357, 384-387:1992）、そのため、前述のW096/26283のようなバースター遺伝子を用いる方法でMS植物（母親）を作成した場合には、F1植物において複数コピーのバースター遺伝子が存在することになり、ジーンサイレンシングの影響で、その発現が抑制されてしまうおそれが生じる。

発明の概要

本発明は、バースター遺伝子を用いることなくバルナーゼ遺伝子により雄性不稔植物を作出する方法を提供する。

本発明は、上記方法に使用する変異バルナーゼ遺伝子およびその製造方法も提供する。

発明の詳細な説明

本発明においては、バルナーゼ遺伝子のDNA配列（R. W. Hartley, J. Mol. Biol. 202, 913-915:1988）の少なくとも一部を変異させ、この変異遺伝子を植物の葯で特異的に発現させることにより、葯以外の組織に対して実質的に不利な影響を及ぼすことなく、当該植物を実質的に雄性不稔化することができるようにする。

変異の方法は、部位特異的変異形成法、制限酵素による一部断片の削除、Low Fidelity PCR法などの公知の方法で行うことができる。好ましい変異方法は、Low Fidelity PCR法である。その詳細は、D. Leung, E. Chen and D. Goedda, Technique 1, 11-15:1989; Y. Z. Xiaoping and R. H. Ebright, Nucleic Acid Res. 19, 6052:1991; G. C. Rice et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5467-5471:1992に記載されており、それらの内容は本明細書に援用される。この技法を用い、増幅時の反応を複数エラーの起きやすい条件下でPCRを行うことで、目的のDNA断片に効率よくランダム変異を導入することが可能である。

本発明においてLow Fidelity PCR法に用いるプライマーは、通常のPCR法と同様にして選択する。プライマーの長さは通常のPCR法と同様の塩基数であることが好ましい。

本発明者らは、配列番号 1 の配列を含むDNAを鋳型に用い、プライマー 1（5'

-CGTTCGGCTC GATGGTACCG GTTATCAACA CGTTTGA-3'、配列番号6)、プライマー
2 (5' -CCTCTAGATT ATCTGATTTT TGTAAGGTC TGATAATG-3'、配列番号7)の組
合せて複数エラーの起きやすい条件下でPCRを行ない、配列番号3に示されるDNA
配列を有する変異バルナーゼ遺伝子を単離することができた。ここで用いた配列
番号1の配列は、公知のプラスミドpVE108 (W092/13956)上に存在するバルナー
ゼ遺伝子のコーディング領域の配列であり、本来のバルナーゼ遺伝子の配列から
N末端側の菌体外への分泌シグナルに当たる不要な部分を取り除いたものである。

同様の方法で、さらに異なる変異バルナーゼ遺伝子を得ることも可能である。

PCR増幅産物は、慣用の技術によって、大腸菌等の宿主中でクローニングし、
変異バルナーゼ遺伝子を含む大腸菌クローンを単離する。このクローニングにお
いて、バルナーゼ遺伝子を有するクローンは、該遺伝子の発現により生じるRNase
活性の測定によりスクリーニングしてもよいが、バルナーゼの有するRNase活性
により、大腸菌の成長が影響を受けることを利用して、以下に述べる2工程から
なる方法によりスクリーニングするのが都合がよい。

第一の工程では、まず、上述のようにして得た変異バルナーゼ遺伝子を用いて
プラスミドを調製し、これにより大腸菌を形質転換する。このようにして得られ
た大腸菌形質転換株は、導入された変異バルナーゼの活性により成長が抑制され
る。この事実に基づき、変異バルナーゼを導入していない対照ベクターを導入し
た大腸菌株と比較して、成長の遅い、すなわちコロニーの大きさが小さいコロ
ニーを選抜する。このようにして選抜された大腸菌株は、変異バルナーゼ遺伝子
を含むことが予想される。そこで、確かに変異バルナーゼ遺伝子が発現すること
により成長抑制が起こっていることを確認するために、次いで第二の工程を行う。

第二の工程においては、バースター遺伝子を用いる。バースターは、前述した
ようにバルナーゼの阻害タンパクである。バースターを発現させた大腸菌中では
、バルナーゼの酵素活性が阻害され、バルナーゼ存在下ではその活性により分解
されるはずのmRNAの分解を阻害することができる。その結果、バースター遺伝子
を発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子により形質転換した場合には、その生育
が抑制されないことになるので、バルナーゼ遺伝子を含まない対照プラスミドに
より形質転換した場合と成長速度を比較すると、両者の成長速度に大きな差はな

く、したがってコロニーのサイズは大きく変化しないと期待される。この原理に基づき、第一の工程で選抜した大腸菌からプラスミドを調製し、これを用いて予めバースター遺伝子を構成的に発現するようにした別の大腸菌を形質転換すると、対照プラスミドにより形質転換した大腸菌と同程度のサイズのコロニーを、変異バルナーゼ遺伝子を含むコロニーとして選択することができる。ここで使用する、バースター遺伝子を構成的に発現する大腸菌の調製は、例えば後記実施例 1 に記載されている方法で行うことができる。

こうして得られた変異バルナーゼ遺伝子は、必要であれば、慣用の方法によって DNA 配列を解析することで、その変異の詳細を調べることができる。

本発明の変異バルナーゼ遺伝子の好ましい一例は、配列番号 3 の DNA 配列を有する。この遺伝子がコードする塩基配列は、野生型活性を示す配列番号 1 の塩基配列と比較すると、開始コドンである ATG の A から数えて 15 番目に T の挿入があり、また 333 番目の A が欠失している。標準的な翻訳様式に従えば、この配列番号 3 の DNA 配列の 1 番目の ATG から翻訳が開始されるとすると、15 塩基目の T の挿入の結果 9 番目のコドンが終止コドンとなり、ここで翻訳が停止することになる。その際に生じる 8 アミノ酸からなるオリゴペプチドがバルナーゼ活性を持つことは考えられないし、正しいフレームで翻訳が開始する可能性のある ATG、GTG などのコドンも近傍に存在しない。しかしながら、バースタータンパク質により大腸菌の生育速度が回復するという前述の事実は、配列番号 3 の遺伝子から正しいフレームでバルナーゼタンパク質の翻訳が起こっていることを強く示唆している。その理由としては、タンパク質への翻訳過程でリボゾームが自動的に読み枠をずらして翻訳する、フレームシフトリコーディング (Frame Shift Re-coding) と呼ばれる現象が起こっている可能性が考えられる。この現象はウィルス、大腸菌、動物のいくつかの遺伝子において報告されており、一般に、特定の塩基配列のみに依存し、特別なタンパク質や翻訳装置などを必要としない。また翻訳時フレームシフトの効率は数%から 50% と遺伝子により様々である。変異バルナーゼ遺伝子の場合には、この翻訳時の読み枠のずれがある低い効率で引き起こされることにより、正しいフレームの翻訳産物が少量だけ生じていると考えられ、これがこの遺伝子の活性が低下した原因であると推測できる。

さらに、バルナーゼ遺伝子を例えばLow Fidelity PCR法で変異させることにより、配列番号3のDNA配列同様に読み枠のずれに伴うかその他の理由で翻訳効率の低下を生じた別の変異バルナーゼ遺伝子が得られる可能性は大きい。さらに、配列番号3のDNA配列中の塩基の一つまたは複数が置換、欠失、挿入、付加されても、開始コドンであるATGのAから数えて15番目のTの挿入、および／または333番目のAの欠失のために、配列番号3のDNA配列同様に読み枠のずれに伴う翻訳効率の低下を生じる変異バルナーゼ遺伝子である可能性が大きい。それらの変異遺伝子は、いずれも配列番号3の遺伝子と同様に、植物で薬特異的に発現させたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することができると考えられ、配列番号3のものと同様に本発明に含まれる。

変異バルナーゼ遺伝子により、雄性不稔化することができる植物としては、本遺伝子が導入され、実質的に雄性不稔化できる植物であれば、特に限定されないが、具体例を挙げると例えばイネ、トウモロコシ、タバコ、レタス、ナタネなどを挙げることができる。この中で特に、イネおよびトウモロコシが好ましい。

植物を雄性不稔化するためには、変異バルナーゼ遺伝子を当該植物の薬で特異的に発現させ、そのRNase活性によって薬の機能を阻害する。薬で特異的に発現させるためには、W092/13957に記載されている方法を用いることができる。簡単に述べると、変異バルナーゼ遺伝子を、薬特異性のプロモーターの下流に連結して、発現ベクターを用いて植物細胞に組み込む。

組み込みのためには、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などがある。

形質転換した植物細胞から植物体を形成するためには、形質転換した植物細胞カルスから再生する。その方法は、例えばY. Hiei et al., Plant J. 6, 271-282:1994の様にすればよい。

このようにして作出した植物体が、雄性不稔化されていることは、これらの植物体を栽培しても、稔性のある花粉を他の植物体から受粉しない限り稔実しないことから確認することができる。

実施例 1. 変異バルナーゼ遺伝子の調製

Low fidelity PCR

プライマー 1 (CGTTCGGCTC GATGGTACCG GTTATCAACA CGTTTGA、配列番号 6) およびプライマー 2 (CCTCTAGATT ATCTGATTTT TGTAAGGTC TGATAATG、配列番号 7) を、S.L. Beaucage et al., Tetrahedron Lett., 22, 1859-1862:1982に記載の方法でDNA合成装置 (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて合成した。

5 公知のプラスミド pVE108 (W092/13956) を鋳型に用い、プライマー 1 およびプライマー 2 の組み合わせでPCRを行った。pVE108のバルナーゼ遺伝子のコーディング領域に対応する部分の配列を配列番号 1 に示す。また、反応条件は次の通りである。すなわち、10mM Tris-HCl (pH9.5)、50mM KCl、2mM MgCl₂、それぞれ1mM

10 のdNTP、10ngの鋳型DNA、0.5unitsのTaq DNAポリメラーゼ中で、94℃ 1分、57℃ 1分、72℃ 1分を、50サイクル行った。

反応後、増幅産物をアガロースゲル電気泳動 (2% SeaKem GTG agarose, 1xTAE) で分離、DEAE-セルロース法 (村松正実編「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善、1988 pp111) により精製したものを鋳型に、上記の条件で再びPCR反応をおこなった。

15

変異導入バルナーゼ遺伝子断片のプラスミドベクターへのライゲーション

反応産物を常法によりSacI、XbaIで消化後、アガロースゲル電気泳動で精製し、挿入断片を調製した。この挿入断片を大腸菌へ導入するためのプラスミドは適宜選択できるか、たとえばプラスミド pHM1を用いることができる。プラスミド pHM1は、プラスミド pBR322のEcoRI部位を切断した後T4 DNAポリメラーゼ (宝酒造) を用いて平滑化後、その制限酵素部位にpUC18からPvuIIで切り出したlacZの発現カセット (322bp) を同様に平滑化した後組み込むことによって作製されたプラスミドである。

20

プラスミド pHM1をSacI、XbaIで消化した後さらに仔ウシ小腸アルカリフォスファターゼ (Calf intestine alkaline phosphatase、宝酒造) により脱リン酸化して、制限酵素処理プラスミド断片を調製した。変異バルナーゼ遺伝子を含む上記挿入断片は、Takara Ligation Kit ver.1 (宝酒造) を用いて制限酵素処理されたpHM1中にライゲーションした。

25

大腸菌への導入とバルナーゼ活性クローンの選抜

バルナーゼ遺伝子が導入された大腸菌は、たとえば次のようにして選抜する。
すなわち、バルナーゼの活性により細胞内でmRNAが分解されるため、タンパク質
の合成が低下して、結果として大腸菌の成長が抑制される。したがって、変異バ
ルナーゼ遺伝子を含まない対照プラスミドで形質転換した大腸菌コロニーと比較
5 してコロニーサイズが小さくなることを利用して、バルナーゼ遺伝子により形質
転換された大腸菌を選抜することができる。なお、野生型バルナーゼ若しくは同
等の活性を保持した変異バルナーゼをpHM1に組み込んだ場合には、大腸菌はコロ
ニーを形成できないため、十分に活性の弱まったクローンのみを選抜することが
可能である。

10 そこで、変異バルナーゼ遺伝子をライゲーションしたプラスミドをエタノール
沈殿した後、このプラスミドをGenePulser (BioRad) を用いたエレクトロポーレ
ーション法により、大腸菌LE392株に導入した。導入手順はBioRad社のマニュア
ルに従っておこなった。同様の手順にしたがって、変異バルナーゼを含まない対
照プラスミドも大腸菌LE392株に導入した。

15 その後、これらの形質転換された大腸菌をテトラサイクリン (25 μ g/ml) を含
むLB寒天培地にプレーティングし、室温 (25 $^{\circ}$ C) で72時間培養後、対照となるプ
ラスミドpHM1を導入した大腸菌のコロニーと比較してコロニーサイズの小さいコ
ロニーを、変異バルナーゼが導入されたプラスミドを含む大腸菌のコロニーとし
て選抜した (表1のA)。

20 バースター遺伝子による変異バルナーゼクロンの選抜

バースターは、前述したようにバルナーゼに対して拮抗作用を有する酵素であ
る。バースターを発現させた大腸菌中では、バルナーゼの酵素活性が阻害され、
バルナーゼ存在下ではその活性により分解されるはずのmRNAの分解を阻害するこ
とができる。その結果、バースターを発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子を挿
25 入したプラスミドにより形質転換した場合には、その生育が抑制されないので、
バースターを発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子含まない対照プラスミドによ
り形質転換した場合と成長速度を比較した場合、その成長速度は両者で大きな差
はなく、したがってコロニーのサイズは大きく変化しないと期待される。

この大腸菌は以下のように作成した。R. W. Hartley, J. Mol. Biol. 202, 913-9

15:1988に記載のバースター遺伝子をHindIIIとXbaIできりだし、tacプロモーター (de Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25:1983) とインフレームで結合し、さらにクロラムフェニコール耐性遺伝子 (N.K. Alton, and D. Vapnek, Nature 282, 864-869:1979) とともに (Herrero et al., J. Bacteriol. 172, 6557-6567:1990) に記載のベクター上の、転移酵素を欠損したトランスポゾン (defective transposon) の内部に結合し、その後、得られたプラスミドを大腸菌MC1061株へ導入し、このトランスポゾン (バースター遺伝子カセットを含む。) を当該大腸菌染色体に転移させた。この大腸菌が安定してバースター遺伝子カセットを維持していることはクロラムフェニコール耐性により確認することが可能である。また大腸菌MC1061株ではlacI遺伝子が欠損しているため、tacプロモーターは常に誘導されており、バースター遺伝子は構成的 (constitutive) に発現することとなる。

エレクトロポレーション法により変異バルナーゼ遺伝子を挿入断片として含むプラスミド、またはそれを含まない対照のプラスミドを大腸菌に導入した後、これらの大腸菌をIPTG (1mM)、テトラサイクリン (25 μ g/mL) を含むLB寒天培地にプレーティングし、25°Cで72時間培養した。その後、変異バルナーゼ遺伝子で形質転換した大腸菌のコロニーの中から、同時に平板培養を開始した対照プラスミドpHM1導入大腸菌コロニーと比較して、コロニーの大きさが変わらないクローン (“#4-31” と命名) を選抜した (表1のB)。

表1 選抜クローンとコロニーの大きさ (mm)

	選抜クローン	pHM1 (対照)
A : E. coli LE392 ^{*1}	1.77 ± 0.33	2.65 ± 0.47
B : バースター遺伝子を 発現させたE. coli ^{*2}	1.39 ± 0.10	1.55 ± 0.08

^{*1} : LB寒天プレート (25 µg/mLテトラサイクリン) 上で28℃、48時間培養後のコロニーの大きさ

^{*2} : LB寒天プレート (25 µg/mLテトラサイクリン) 上で28℃、24時間培養後のコロニーの大きさ

実施例 2. 変異バルナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例 1 で選抜した大腸菌から、本発明の目的に適したクローン化された変異バルナーゼ遺伝子を調製した。まず、実施例 1 で選抜したクローン#4-31を調製した。次いでクローン#4-31に組み込まれた変異バルナーゼ遺伝子断片をKpnI、XbaIで切り出し、同様にKpnI、XbaIで切断したpUC119のKpnI、XbaIサイトにライゲーションした。このプラスミドを大腸菌を用いて増幅させた後、Taqポリメラーゼを用いたサイクルシーケンス法を用いて (Taq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Inc.)、メーカーのプロトコルに従って反応を行い、次いでApplied Biosystems社製のDNAシーケンサー (Model 373A) で配列を解析した。その結果、配列番号 3 に示す配列を得た。この配列は、本来のバルナーゼ遺伝子のDNA配列と比較して、開始コドンであるATGのAから数えて15番目にTの挿入があり、また333番目のAが欠失している。

実施例 3. 弱毒性変異バルナーゼ遺伝子を用いた雄性不稔イネの作成

上述したようにpUC119に組み込んだ弱毒性変異バルナーゼ遺伝子を、プラスミ

ドを制限酵素XbaI、KpnIで切断して利用し、配列番号5に示すプラスミドベクター-pTS431を構築した。pTS431は既知のプラスミドであるpVE108プラスミド（PCT出願国際公開第9213956号）とは以下の点に相違があるが、薬特異的プロモーターと変異バルナーゼ部分を除き、実質的に等価であると考えられる。

5 (1) pVE108プラスミドではバルナーゼ遺伝子（配列番号1）を導入していた部分が、本発明のpTS431では変異バルナーゼ遺伝子（配列番号3）に変更されている。

(2) pVE108プラスミドではタバコ由来の薬特異的プロモーターを使用していたが、本発明のpTS431ではイネE1遺伝子（PCT出願国際公開第9213956号）由来の薬特異的プロモーターに変更している。

10 (3) 本発明では、バルナーゼ遺伝子の上流にpVE108プラスミドでは使用されていなかった1376bpの35S3プロモーター（EP 0344029）を用いている。

(4) 本発明では、バルナーゼ遺伝子の下流部にpVE108プラスミドでは使用されていなかったpJD884（PCT出願国際公開第9309218号）から切り出したAgrobacterium T-DNA gene7の下流部由来の配列を用いている。

15 (5) 本発明では、pUC19に由来する部分からlacZに相当する領域を取り除いている。なお、変異型ではなく、従来型のバルナーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド（pTS172）を配列番号4に示す。

pTS431（変異バルナーゼ遺伝子導入プラスミド、配列番号5）、pTS172（バルナーゼ遺伝子導入プラスミド、配列番号4）から制限酵素EcoRIによりそれぞれ約4.5kbpの断片を切り出し、中間ベクター pSB11（T. Komari et al., Plant J. 10(1), 165-174:1996）の EcoRI部位に挿入し、さらに相同組換えによりそのT-DNA 領域をacceptor vector pSB1（T. Komari et al., Plant J. 10(1), 165-174:1996）に組み込んだ。この組換え型プラスミド（それぞれpSB1431、pSB1172）を
25 もつAgrobacterium tumefaciens LBA4404をイネ（品種アサノヒカリ）の形質転換に用いた。形質転換の方法は、基本的に樋江井らの方法（Plant J. 6(2), 271-282:1994）に従ったが、構築した雄性不稔遺伝子が選抜マーカーとしてbar遺伝子（phosphinithricine acetyl transferaseをコードする）を含んでいるので、形質転換の際の選抜には、形質転換は選抜にphosphinothricine（濃度10mg/L）

を用いた。phosphinothricineは、遺伝子が導入されたカルスを選抜するために用いる。

- 5 イネにおいて、野生型バルナーゼ遺伝子を利用した場合と変異バルナーゼ遺伝子を利用した場合とを比較すると、形質転換の効率、形態の正常な雄性不稔形質転換の割合は表2のように変異バルナーゼの導入により顕著に改善された。

表2 形質転換効率

	感染 カルス数	再分化 カルス数	PCR陽性 系統数* ¹	形態の正常な 雄性不稔系統数
pSB1172 (対照)	2838	83	52/83	9/52 (17.3%)
pSB1431 (対照)	787	69	43/45* ²	27/28* ³ (96.4%)

*¹ : PCRによりバルナーゼの断片遺伝子を検出

*² : 69系統のうち45系統のみ調査

*³ : 43系統のうち28系統のみ調査

発明の効果

- 10 本発明において、変異により効果を弱めたバルナーゼ遺伝子を作成し、これを用いた雄性不稔遺伝子を植物に導入することにより、バースター遺伝子を用いずに、単一の遺伝子により、好ましくない形質を持たない雄性不稔植物を効率よく得ることに成功した。

請求の範囲

1. バルナーゼをコードする遺伝子において、該遺伝子のDNA配列の少なくとも一部に変異を有することにより、該変異遺伝子を植物中で薬特異的に発現させたとき、当該植物を薬以外の組織に対して実質的に不都合な影響を及ぼすことなく、実質的に雄性不稔化することができる、変異バルナーゼ遺伝子。

2. 変異が、フレームシフトトリコーディング生じる変異である、請求項1に記載の遺伝子。

3. 配列番号1に記載のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNA配列において、1または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加され、かつ植物中で薬特異的に発現させたとき当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とするタンパク質をコードする遺伝子。

4. 配列番号1に記載のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNA配列において、1または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加されたDNA配列であって、その上流に薬特異的な発現をもたらすプロモーター配列を有し、植物ゲノム中に導入されたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする遺伝子。

5. 配列番号3で示され、かつ植物中で薬特異的に発現させたとき当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とするタンパク質をコードする遺伝子。

6. 配列番号3で示される配列、およびその上流に存在して薬特異的な発現をもたらすプロモーター配列を有し、植物ゲノム中に導入されたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする遺伝子。

7. 請求項1ないし請求項6のいずれか1項に記載の遺伝子を含み、宿主植物中で該遺伝子を発現することができる組換えベクター。

8. 請求項1ないし請求項6のいずれか1項に記載の変異バルナーゼ遺伝子を用いて植物を形質転換し、該変異バルナーゼ遺伝子を薬特異的に発現させることにより当該植物を雄性不稔化する方法。

9. 変異バルナーゼ遺伝子による植物の形質転換が、該遺伝子を植物のゲノムへ組み込むことにより行われる、請求項8の方法。

10. 請求項1ないし請求項6のいずれか1項に記載の遺伝子を導入した形質
転換植物。

<110> Japan Tobacco Inc.

＜120＞ 変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物

<130> 980687

<160> 7

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 343

<212> DNA

<213> Bacillus amyloliquefaciens

 $\langle 220 \rangle$

<221> NAME/KEY: CDS

<222> 1., 336

 $\langle 400 \rangle$ 1

atg gta ccg gtt atc aac acg ttt gac ggg gtt gcg gat tat ctt cag 48

Met Val Pro Val Ile Asn Thr Phe Asp Gly Val Ala Asp Tyr Leu Gln

1 5 10 15

aca tat cat aag cta cct gat aat tac att aca aaa tca gaa gca caa 96

Thr Tyr His Lys Leu Pro Asp Asn Tyr Ile Thr Lys Ser Glu Ala Gln

20 25 30

gcc ctc ggc tgg gtg gca tca aaa ggg aac ctt gca gac gtc gct ccg 144

Ala Leu Gly Trp Val Ala Ser Lys Gly Asn Leu Ala Asp Val Ala Pro

35 40 45

ggg aaa agc atc ggc gga gac atc ttc tca aac agg gaa ggc aaa ctc 192

Gly Lys Ser Ile Gly Gly Asp Ile Phe Ser Asn Arg Glu Gly Lys Leu



u

.



.

.

50	55	60	
ccg ggc aaa agc gga cga aca tgg cgt gaa gcg gat att aac tat aca			240
Pro Gly Lys Ser Gly Arg Thr Trp Arg Glu Ala Asp Ile Asn Tyr Thr			
65	70	75	80
tca ggc ttc aga aat tca gac cgg att ctt tac tca agc gac tgg ctg			288
Ser Gly Phe Arg Asn Ser Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Trp Leu			
	85	90	95
att tac aaa aca acg gac cat tat cag acc ttt aca aaa atc aga taa			336
Ile Tyr Lys Thr Thr Asp His Tyr Gln Thr Phe Thr Lys Ile Arg			
	100	105	110
ggtaacc			343

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 2

Met Val Pro Val Ile Asn Thr Phe Asp Gly Val Ala Asp Tyr Leu Gln			
1	5	10	15
Thr Tyr His Lys Leu Pro Asp Asn Tyr Ile Thr Lys Ser Glu Ala Gln			
	20	25	30
Ala Leu Gly Trp Val Ala Ser Lys Gly Asn Leu Ala Asp Val Ala Pro			
	35	40	45
Gly Lys Ser Ile Gly Gly Asp Ile Phe Ser Asn Arg Glu Gly Lys Leu			
	50	55	60
Pro Gly Lys Ser Gly Arg Thr Trp Arg Glu Ala Asp Ile Asn Tyr Thr			
	65	70	75
Ser Gly Phe Arg Asn Ser Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Trp Leu			





aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggtttaca tcgaactgga tctcaacagc 300
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 360
 gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg ggcaagagca actcgggtcgc 420
 cgcatacact attctcagaa tgacttgggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgccca taaccatgag tgataacact 540
 gcggccaact tactttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac 600
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 660
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcggg ctggctgggt tattgtgat 840
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggg 900
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 1020
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag 1080
 gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140
 cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 1200
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggg ttgtttgccg 1260
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1440
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1500
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560
 ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat 1620
 ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680
 tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 1800
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttateccc tgattctgtg 1860
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920
 cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcgga gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980



gcgcgttggc ctgatcagaa ttcatatgca cgtgttcccg atctagtaac atagatgaca 2040
 ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatitt gttttctatc gcgtattaaa 2100
 tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160
 tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220
 cggcaacagg attcaatctt aagaaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg 2280
 aggttacctt atctgatttt tgtaaaggctc tgataatggc ccgttgtttt gtaaatcagc 2340
 cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400
 gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttgccc gggagtttgc cttccctgtt tgagaagatg 2460
 tctccgccga tgcttttccc cggagcgcacg tctgcaaggc tcccttttga tgccaccag 2520
 ccgagggtt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580
 agataatccg caaccccgctc aaacgtgttg ataaccgcta ccatcgcgac ggcttgatgg 2640
 atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700
 ttttgtaggc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggc gagtcacggc gcaagcgtgc 2760
 gcaagtgact gcaacaacca aggacggcga ttggcgaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820
 acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgttgctcc gtccattagg tgcattctca 2880
 ccgttggcca gaacaggacc gttcaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggtta 2940
 atgtatggca aatagtagta aattttgccc ccattggctt ggctgagata gaacatatc 3000
 tggaaagcct ctagcatatc tttttgaca gctaaacttt gcttcttgcc ttcttggctt 3060
 agcaatgacg ttgccatgt cgtggcaaac atctggtaag gtaactgtat tcgtttgttc 3120
 ccttcaacgg ctcaatcccc acaggccaag ctatcctttc cttggcagta taggctcctt 3180
 gagagattat actaccattt ttaagtgtt ataaagacga tgctctctaa ccagatcgat 3240
 cagaaacaca aagttttagc agcgtaatat cccacacaca tacacacacg aagctatgcc 3300
 tcctcatitt ccgagagatt ctgacagtga ccagaatgtc agaatgcat ttcatgggca 3360
 caagtcgac cacaagcttc ttggtggagg tcaagggtgt ctattattat tcgctttcta 3420
 ggaaattatt cagaattagt gccttttctc ataacttctc tctgagccga tgtggttttg 3480
 gatttcattg ttgggagcta tgcagttgcg gatattctgc tgtggaagaa caggaaacta 3540
 tctgcggggg tccttgctgg ggcaacattg atatggttcc tgttcgatgt agtagaatac 3600
 aatataattc cgctcctttg ccagattgcc attcttgcca tgcttgtgat cttcatttgg 3660
 tcaaatgccg caccactctt ggacaggat tagctttatt tcctgtggag atggtagaaa 3720



actcagctta cagaaatggc atttcacgta gtataacgca agacattagg tactaaaaact 3780
caactaactg tttccgaatt tcagggcccc tccaaggatc ccagaaatca tcattctctga 3840
acatgccttc agagaaatgg cattgaccgt ccattacaaa ctaacgtaca ctgtatctgt 3900
tctttacgac attgcatgtg gaaaggatct gaagagattt ctcctggtac ataataatct 3960
actcctttgc tacgttaata agagatgtaa aaacatgcaa cagttccagt gccaacattg 4020
tccaaggatt gtgcaattct ttctggagcg ctaaaattga ccagattaga cgcacacagaa 4080
tattgaattg cagagttagc caataatcct cataatgtta atgtgctatt gttgttcaact 4140
actcaatata gttctggact aacaatcaga ttgtttatga tattaagggtg gttggatctc 4200
tattggtatt gtcggcgatt ggaagttctt gcagcttgac aagtctacta tatattggtg 4260
ggtattccag ataaatatta aattttaata aaacaatcac acagaaggat ctgcggccgc 4320
tagcctaggc ccggggccac aaaaatctga gcttaacagc acagttgctc ctctcagagc 4380
agaatcgggt attcaacacc ctcatatcaa ctactacgtt gtgtataacg gtccacatgc 4440
cggatatatac gatgactggg gttgtacaaa ggcggaaca aacggcggtc ccggagttgc 4500
acacaagaaa tttgccacta ttacagaggc aagagcagca gctgacgct acacaacaag 4560
tcagcaaaca gacaggttga acttcatccc caaaggagaa gctcaactca agcccaagag 4620
ctttgctaag gccctaaca gcccacaaa gcaaaaagcc cactggctca cgctaggaac 4680
caaaaggccc agcagtgatc cagcccaaaa agagatctcc ttgccccgg agattacaat 4740
ggacgatttc ctctatcttt acgatctagg aaggaagttc gaaggtgaag gtgacgacac 4800
tatgttcacc actgataatg agaaggtag cctcttcaat ttcagaaaga atgctgaccc 4860
acagatggtt agagaggcct acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc cgagtaacaa 4920
tctccaggag atcaaatacc ttccaagaa ggttaaagat gcagtcaaaa gattcaggac 4980
taattgcatc aagaacacag agaaagacat atttctcaag atcagaagta ctattccagt 5040
atggacgatt caaggcttgc ttcataaacc aaggcaagta atagagattg gagtctctaa 5100
aaaggtagtt cctactgaat ctaaggccat gcatggagtc taagattcaa atcgaggatc 5160
taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 5220
acaagaagaa aatcttcgtc aacatggttg agcacgacac tctggtctac tccaaaaatg 5280
tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa aggataattt 5340
cgggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag 5400
aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcattcaag 5460



atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 5520
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgacatc tccactgacg 5580
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt 5640
 catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctataaat ctatctctct 5700
 ctctataacc atggaccacg aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga 5760
 catgccggcg gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg 5820
 taccgagccg caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta 5880
 tccctggctc gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgccctacg cgggcccctg 5940
 gaaggcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccgcca 6000
 ccagcggacg ggactgggct ccacgtctta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca 6060
 gggcttcaag agcgtggtcg ctgtcatcgg gctgccaac gaccgagcg tgcgatgca 6120
 cgaggcgctc ggatatgccc cccgcggcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa 6180
 ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt 6240
 cctgcccgtc accgagatct gagatcacgc gttctaggat ccccgatga gctaagctag 6300
 ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tatcgactc agtctttcat ctacggcaat 6360
 gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat 6420
 ttatgttttt gcttggacta taataacctg cttgttattt tatcaataaa tatttaaact 6480
 atatttcttt caagatggga attaacatct acaaattgcc tttcttata gaccatgtac 6540
 gtatcgcg 6548

<210> 5

<211> 6539

<212> DNA

<213> Escherichia coli LE392

<220>

<223> Clone: pTS431

<400> 5

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60



ttatTTTTct	aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	120
cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	180
ccctTTTTtg	cggcattttg	ccttcctgtt	tttgctcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	240
aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	300
ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	360
gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	420
cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	480
acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	agtgctgcc	taaccatgag	tgataacact	540
gcggccaaact	tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	600
aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	cgttgggaac	cggagctgaa	tgaagccata	660
ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaaacta	720
ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	780
gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	840
aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	900
aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	960
aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	1020
gtttactcat	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	1080
gtgaagatcc	tttttggtc	gagtctcatg	accaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	1140
cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	1200
cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	1260
gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	1320
aatactgtcc	ttctagtgt	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	1380
cctacatacc	tcgtctgtct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	1440
tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	1500
acgggggggt	cgtgcacaca	gccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	1560
ctacagcgtg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	1620
ccggtaaagc	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	1680
tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	1740
tgctcgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	1800



ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920
 cgcagcgagt cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980
 gcgcgttggc ctgatcagaa ttcttccccg tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcgat 2040
 aatttatcct agtttgcgcg ctatattttg ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc 2100
 gggactctaa tcataaaaac ccatctcata aataacgtca tgcattacat gttaattatt 2160
 acatgcttaa cgtaattcaa cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga 2220
 ttcaatctta agaaacttta ttgccaaatg tttgaacgat ctgcttcgga tcctctagat 2280
 tactgatttt tgtaaaggtc tgataatggt ccgttgtttt gtaaatacgc cagtcgcttg 2340
 agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc gcttcacgcc 2400
 atgttcgtcc gcttttgccc gggagtttgc cttccctgtt tgagaagatg tctccgccga 2460
 tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag ccgagggctt 2520
 gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga agataatccg 2580
 caaccccgtc aaacgtgttg aataaccggt accatcgcca cggcttgatg gatctcttgc 2640
 tggacaccgg gatgctagga tgggttatcg tggccggcgt gcgtgtgtgg cttttgtagg 2700
 cgccggcgac ggcgggggca atgtggcagg tgagtcacgg tgcaagcgtg cgcaagtgc 2760
 tgcaacaacc aaggacggtc atggcgaaag caccacacgc gtccaccgac tacaggatgt 2820
 agcagtagca cggtgaaaga agtggtgtcc cgtccattag gtgcattctc accgttggcc 2880
 agaacaggac cgttcaacag ttaggttagg tgtaggactt ttacgtgggt aatgtatggc 2940
 aaatagtagt aaattttgcc cccattggtc tggtgagat agaacaatatt ctggaaagcc 3000
 tctagcatai cttttttgac agctaaactt tgcttcttgc cttcttggtc tagcaatgac 3060
 gttgcccata tcgtggcaaa catctggtaa ggtaactgta ttcgtttgtt cccttcaacg 3120
 gctcaatccc cacaggccaa gctatccttt ccttggcagt ataggctcct tgagagatta 3180
 tactaccatt ttttaagtgt tataaagacg atgtctctta accagatcga tcagaaacac 3240
 aaagttttag cagcgtaata tcccacacac atacacacac gaagctatgc ctccatctt 3300
 tccgagagat tctgacagtg accagaatgt cagaatgcca tttcatgggc acaagtcgat 3360
 ccacaagctt cttggtggag gtcaagggtg gctattatta ttcgctttct aggaaattat 3420
 tcagaattag tgccttttat cataacttct ctctgagccg atgtgggttt ggatttcatt 3480
 gttgggagct atgcagttgc ggatattctg ctgtggaaga acaggaactt atctgcgggg 3540



gtccttgctg gggcaacatt gatatggttc ctgttcgatg tagtagaata caatataatt 3600
 ccgctccttt gccagattgc cattcttgcc atgcttgtga tcttcatttg gtcaaatgcc 3660
 gcaccactct tggacaggta ttagctttat ttcctgtgga gatggtagaa aactcagctt 3720
 acagaaatgg catttcacgt agtataacgc aagacattag gtactaaaac tcaactaact 3780
 gtttccgaat ttcagggccc ctccaaggat ccagaaaac atcatctctg aacatgcctt 3840
 cagagaaatg gcattgaccg tccattacaa actaacgtac actgtatctg ttctttacga 3900
 cattgcatgt ggaaaggatc tgaagagatt tctcctggta cataataatc tactcctttg 3960
 ctacgttaat aagagatgta aaaacatgca acagttccag tgccaacatt gtccaaggat 4020
 tgtgcaattc tttctggagc gctaaaattg accagattag acgcatcaga atattgaatt 4080
 gcagagttag ccaataatcc tcataatgtt aatgtgctat tgttgttcac tactcaatat 4140
 agttctggac taacaatcag attgtttatg atattaaggt ggttggatct ctattggtat 4200
 tgtcggcgat tggaagttct tgcagcttga caagtctact atatatgggt aggtattcca 4260
 gataaatatt aaattttaat aaaacaatca cacagaagga tctgcggccg ctagcctagg 4320
 cccgggccc aaaaaatctg agcttaacag cacagttgct cctctcagag cagaatcggg 4380
 tattcaacac cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacatg ccggtatata 4440
 cgatgactgg ggttgtaaa aggcggaac aaacggcggt cccggagttg cacacaagaa 4500
 atttgccact attacagagg caagagcagc agctgacgag tacacaacaa gtcagcaaac 4560
 agacaggttg aacttcatcc ccaaaggaga agctcaactc aagcccaaga gctttgctaa 4620
 ggccctaaca agcccaccaa agcaaaaagc ccaactggctc acgctaggaa ccaaaaggcc 4680
 cagcagtgat ccagcccaa aagagatctc ctttgccccg gagattacaa tggacgattt 4740
 cctctatctt tacgatctag gaaggaagtt cgaaggtgaa ggtgacgaca ctatgttcac 4800
 cactgataat gagaaggtta gcctcttcaa tttcagaaag aatgctgacc cacagatggg 4860
 tagagaggcc tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagtaaca atctccagga 4920
 gatcaaatac cttccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaattgcat 4980
 caagaacaca gagaaagaca ttttctcaa gatcagaagt actattccag tatggacgat 5040
 tcaaggcttg cttcataaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta aaaaggtagt 5100
 tctactgaa tctaaggcca tgcattggat ctaagattca aatcgaggat ctaacagaac 5160
 tcgccgtgaa gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga 5220
 aaatcttcgt caacatgggtg gagcacgaca ctctgggtcta ctccaaaaat gtcaaagata 5280



cagtctcaga agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aaggataatt tcgggaaacc 5340
tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc acttcatcga aaggacagta gaaaaggaag 5400
gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcattcaa gatgcctctg 5460
ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg 5520
ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgacat ctccactgac gtaagggatg 5580
acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt 5640
tggagaggac acgtgaaat caccagtctc tctctataaa tctatctctc tctctataac 5700
catggaccca gaacgacgcc cggccgacat ccgccgtgcc accgaggcgg acatgccggc 5760
ggtctgcacc atcgtcaacc actacatcga gacaagcacg gtcaacttcc gtaccgagcc 5820
gcaggaaccg caggagtgga cggacgacct cgtccgtctg cgggagcgct atccctggct 5880
cgtcgccgag gtggacggcg aggtcgccgg catcgctac gcgggcccct ggaaggcacg 5940
caacgcctac gactggacgg ccgagtcgac cgtgtacgtc tcccccgcc accagcggac 6000
gggactgggc tccacgctct acaccacct gctgaagtcc ctggaggcac agggcttcaa 6060
gagcgtggtc gctgtcatcg ggctgccccaa cgacccgagc gtgcgcatgc acgaggcgct 6120
cgatatgcc ccccgcgga tgctcggggc ggccggcttc aagcacggga actggcatga 6180
cgtgggtttc tggcagctgg acttcagcct gccggtaccg ccccgctcgg tcctgcccgt 6240
caccgagatc tgagatcacg cgttctagga tccccgatg agctaagcta gctatatcat 6300
caatttatgt attacacata atatgcact cagtctttca tctacggcaa tgtaccagct 6360
gatataatca gttattgaaa tatttctgaa tttaaacttg catcaataaa tttatgtttt 6420
tgcttggact ataatacctg acttggttatt ttatcaataa atatitaaac tatatttctt 6480
tcaagatggg aattaacatc taaaaattgc cttttcttat cgaccatgta cgtatcgcg 6539

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 1



.

.

.



.

.

<400> 6

cgttcggctc gatggtaccg gttatcaaca cgtttga 37

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 2

<400> 7

cctctagatt atctgatttt tgtaaaggctc tgataatg 38



1

2



3

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁶ C12N15/55, C12N9/22, C12N15/82, A01H1/00, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁶ C12N15/55, C12N9/22, C12N15/82, A01H1/00, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/BIOSIS (DIALOG), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/26283, A (Plant Genetic Systems N.V.), 29 August, 1996 (29. 08. 96) & EP, 811070, A1 & JP, 11-500617, A	1-10
A	Journal of Immunology Vol. 147 No. 8 (1991) Fettes J.V. et al., "A frameshift mutation at the amino terminus of the nucleoprotein gene does not affect generation of cytotoxic T lymphocyte epitopes" p.2697-2705	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 October, 1999 (28. 10. 99)Date of mailing of the international search report
9 November, 1999 (09. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



,

,



,

,

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N9/22, C12N15/82, A01H1/00, A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N9/22, C12N15/82, A01H1/00, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG)

REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/26283, A (Plant Genetic Systems N.V.) 29.8月.1996(29.08.96) & EP, 811070, A1 & JP, 11-500617, A	1-10
A	Journal of Immunology Vol.147 No.8 (1991) Fettes J.V. et al. "A frameshift mutation at the amino terminus of the nucleoprotein gene goes not affect generation of cytotoxic T lymphocyte epitopes" p.2697-2705	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.10.99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



3
.
2



4

5
.
1

(51) 国際特許分類6 C12N 15/55, 9/22, 15/82, A01H 1/00, 5/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/08176 (43) 国際公開日 2000年2月17日(17.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04167 (22) 国際出願日 1999年8月3日(03.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/220060 1998年8月4日(04.08.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 浜田和行(HAMADA, Kazuyuki)(JP/JP) 中木戸文夫(NAKAKIDO, Fumio)(JP/JP) 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP) <i>TITLE</i>		(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: <u>MUTATED BARNASE GENE AND PLANT TRANSFORMED BY THE SAME</u> (54) 発明の名称 変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物 (57) Abstract A male sterile plant which is free from any undesirable character is constructed by expressing a barnase gene alone specifically in the anther. The barnase gene, which has been depressed by mutagenesis while sustaining its activity, is transferred into a plant and then expressed specifically in the anther to thereby efficiently give the aimed male sterile transformant.		

